

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **61219387 A**(43) Date of publication of application: **29.09.86**

(51) Int. Cl

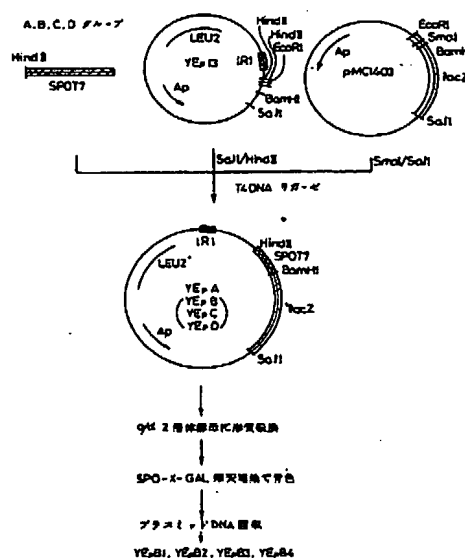
**C12N 15/00****C12N 1/16****C12Q 1/02****/(C12N 1/16 , C12R 1:865 )**(21) Application number: **60060843**(22) Date of filing: **27.03.85**(71) Applicant: **SUNTORY LTD**(72) Inventor: **OSHIMA TAKEHIRO  
TANAKA KAZUMA**(54) **NOVEL YEAST PLASMID AND  
TRANSFORMATION THEREOF**

COPYRIGHT: (C)1986,JPO&amp;Japio

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To provide the titled plasmid obtained by integrating a DNA fragment linked with a specific structural gene of *Escherichia coli* at the downstream side of the sporulation gene of a yeast, and useful for the screening of anticancer agent or carcinostatic agent.

**CONSTITUTION:** (A) The fragment group AWD obtained by decomposing SPOT7 gene participating in the sporulation of yeast with a restriction enzyme, (B) the Sal-HindIII fragment containing YER13, LEU2 and 1R1 of yeast and (C) Small-SalI fragment of plasmid pMC1403 containing lacZ of the structure gene region of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase are mixed together, linked together using T4DNA ligase to form YEPAWD, and introduced into an  $\alpha/\alpha$ -type diploid yeast. The yeast is cultured in an agar medium containing  $KC_2H_3O_2$ , etc., the transformation giving blue colony is separated, and the yeast plasmid YEPAWD integrated with SPOT7 gene fragment is recovered from the transformation.



## ⑫ 公開特許公報(A) 昭61-219387

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和61年(1986)9月29日  
C 12 N 15/00 7115-4B  
1/16 6712-4B  
C 12 Q 1/02 8213-4B  
//C 12 N 1/16  
C 12 R 1:865) 審査請求 未請求 発明の数 9 (全20頁)

⑮ 発明の名称 新規な酵母プラスミドおよびその形質転換体

⑯ 特 願 昭60-60843

⑰ 出 願 昭60(1985)3月27日

⑱ 発 明 者 大 島 武 博 高槻市別所本町17番10-383  
⑲ 発 明 者 田 中 一 馬 高槻市氷室町1丁目1番10号 サントリー富田寮  
⑳ 出 願 人 サントリー株式会社 大阪市北区堂島浜2丁目1番40号  
㉑ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

新規な酵母プラスミドおよびその形質転換体

## 2. 特許請求の範囲

1. 酵母の胞子形成に関与する遺伝子の下流に大腸菌β-ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域が連結されたDNA断片が組み込まれた酵母プラスミド。

2. 酵母の胞子形成に関与する遺伝子が発現されるとそれに伴って大腸菌β-ガラクトシダーゼの構造遺伝子も発現されるように、酵母の胞子形成に関与する遺伝子と大腸菌β-ガラクトシダーゼの構造遺伝子が連結されていることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の酵母プラスミド。

3. 酵母の胞子形成に関与する遺伝子がSP017で表わされる特許請求の範囲第1項又は第2項記載の酵母プラスミド。

4. 大腸菌β-ガラクトシダーゼ構造遺伝子領域がlacZで表わされる特許請求の範囲第1項又は第2項記載の酵母プラスミド。

5. 酵母がサッカロマイセス(Saccharomyces)属に属する特許請求の範囲第1項〜第3項のいずれか1項に記載の酵母プラスミド。

6. YB<sub>83</sub>で表わされる特許請求の範囲第1項〜第5項のいずれか1項に記載の酵母プラスミド。

7. 酵母の胞子形成に関与する遺伝子が発現されるとそれに伴って大腸菌β-ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域も発現されるように酵母の胞子形成に関与する遺伝子と大腸菌β-ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域が連結されたDNA断片、および動物の発癌遺伝子とホモロジーを有し且つ突然変異を含む酵母由来の遺伝子が組み込まれた酵母プラスミド。

8. 動物の発癌遺伝子がヒトras遺伝子である特許請求の範囲第7項記載の酵母プラスミド。

9. 発癌遺伝子とホモロジーのある酵母由来の遺伝子が酵母の由来のRAS2遺伝子である特許請求の範囲第7項記載の酵母プラスミド。

10. 酵母由来の遺伝子上の突然変異が酵母の胞子形成を抑制するような点突然変異(point muta-

tion)である特許請求の範囲第7項記載の酵母プラスミド。

11. 点突然変異が、RAS2<sup>V61L</sup>またはRAS2<sup>L60V</sup>で表わされる変異である特許請求の範囲第10項記載の酵母プラスミド。

12. YEpB3-RAS2<sup>V61L</sup>またはYEpB3-RAS2<sup>L60V</sup>で表される特許請求の範囲第7項〜11項のいずれか1項に記載の酵母プラスミド。

13. 酵母の胞子形成に関与する遺伝子が発現されるとそれに伴って大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域も発現されるように酵母の胞子形成に関与する遺伝子と大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域とが連結されたDNA断片、および動物の発癌遺伝子とホモロジーを有し且つ突然変異を含む酵母由来の遺伝子が組み込まれた酵母プラスミドによって形質転換されたMAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ 型2倍体酵母形質転換株。

14. 上記新規な酵母プラスミドがYEpB3-RAS2<sup>V61L</sup>またはYEpB3-RAS2<sup>L60V</sup>である特許請求の範囲第13項記載の形質転換株。

範囲第17項記載の酵母形質転換株。

19. 酵母の胞子形成に関与する遺伝子が発現されるとそれに伴って大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域も発現されるように酵母の胞子形成に関与する遺伝子と大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域とが連結されたDNA断片、および動物の発癌遺伝子とホモロジーを有し且つ突然変異を含む酵母由来の遺伝子が組み込まれた酵母プラスミドと、MAT $\alpha$ またはMAT $\alpha$ で表される酵母の接合型支配対立遺伝子とが組み込まれた酵母プラスミドとによって形質転換された1倍体酵母形質転換株。

20. YEpB3-RAS2<sup>V61L</sup>又はYEpB3-RAS2<sup>L60V</sup>で表わされるプラスミドと、YCpMAT $\alpha$ またはYCpMAT $\alpha$ で表わされるプラスミドとにより形質転換された特許請求の範囲第19項記載の酵母形質転換株。

21. 酵母の胞子形成に関する遺伝子が発現されるとそれに伴って大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域も発現されるように酵母の胞子形成に関与する遺伝子と大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダー

15. 動物の発癌遺伝子とホモロジーを有し且つ突然変異を含む酵母由来の遺伝子と、MAT $\alpha$ またはMAT $\alpha$ で表される酵母の接合型支配対立遺伝子とが組み込まれた酵母プラスミド。

16. YCpMAT $\alpha$ -RAS2<sup>V61L</sup>またはYCpMAT $\alpha$ -RAS2<sup>L60V</sup>で表される特許請求の範囲第15項記載の酵母プラスミド。

17. 酵母の胞子形成に関与する遺伝子が発現されるとそれに伴って大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子も発現されるように酵母の胞子形成に関与する遺伝子と大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子とが連結されたDNA断片が組み込まれた酵母プラスミドと、動物の発癌遺伝子とホモロジーを有し且つ突然変異を含む酵母由来の遺伝子とMAT $\alpha$ またはMAT $\alpha$ で表される酵母の接合型支配対立遺伝子とが組み込まれた酵母プラスミドとによって形質転換された1倍体酵母形質転換株。

18. YEpB3で表されるプラスミドと、YCpMAT $\alpha$ -RAS2<sup>V61L</sup>またはYCpMAT $\alpha$ -RAS2<sup>L60V</sup>で表されるプラスミドとによって形質転換された特許請求の

構造遺伝子領域とが連結されたDNA断片が組み込まれている酵母プラスミド、およびMAT $\alpha$ またはMAT $\alpha$ で表される酵母の接合型支配対立遺伝子とが組み込まれたプラスミドによって形質転換された、核内染色体上にRAS変異をもつ1倍体形質転換株。

22. RAS変異がRAS2<sup>V61L</sup>またはRAS2<sup>L60V</sup>で表される変異である特許請求の範囲第21項記載の形質転換株。

23. 酵母の胞子形成に関与する遺伝子が発現されるとそれに伴って大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域も発現されるように酵母の胞子形成に関与する遺伝子と大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域とが連結されたDNA断片が組み込まれている酵母プラスミドによって形質転換された、核内染色体上にRAS変異とsir3変異をもつ1倍体形質転換株。

24. RAS変異がRAS2<sup>V61L</sup>またはRAS2<sup>L60V</sup>で表される変異である特許請求の範囲第23項記載の形質転換株。

25. 動物の発癌遺伝子とホモロジーを有し且つ、突然変異を含む酵母由来の遺伝子を有するために胞子形成に関与する遺伝子の発現が抑制され結果的に SPO-X-GAL培地上で白色コロニーを形成する酵母形質転換体を、被験物質の存在下で SPO-X-GAL培地上で青色のコロニーを形成することができるようにある該被験物質から選ばれることを特徴とする抗癌作用または制癌作用を有する物質のスクリーニング法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### (産業上の利用分野)

本発明は、新規な酵母プラスミドおよび形質転換体に関する。さらに詳しくは、新しいタイプの抗癌または制癌剤のスクリーニングに有用な新規な酵母プラスミドおよび該プラスミドが導入された形質転換酵母、並びに該形質転換酵母の利用に関する。

(Gly)、あるいは61番目のグルタミン(Gln)に対応する塩基配列(コドン)に変異がおきており、それらのアミノ酸が他のアミノ酸に変っていることである。そして、このような変異蛋白が正常細胞を異常な増殖をする癌細胞に転換する引金になっていると考えられている。また、このような変異 ras 遺伝子は特定の癌種に限らず多くの癌の組織や細胞に見出されている。

一方、近年米国のゴールドスプリングハーバー研究所のWiglerらのグループとMerk社のScolnickらにより、酵母にもヒトの ras 遺伝子と高い類似性(ホモロジー)を有する遺伝子が2個(RAS1とRAS2)存在することが見出され、それらの遺伝子の塩基配列も決められている(Powers, S. 等、セル(Cell)36, 607, 1984; および Defeo-Jones 等、ネイチャー(Nature)、306, 707, 1983)。またこれら酵母の遺伝子から生産される蛋白は、ヒト ras 蛋白に対して調製された抗体と交叉反応することも明らかにされている。そして興味あることには、サッカロマイセス(*Saccharomyces*)属(以下単に

(従来の技術)

近年、分子生物学の進展に伴い、発癌または悪性腫瘍形成に関与する遺伝子(以下発癌遺伝子と呼ぶ)について多くの知見が蓄積されてきている。例えば、これまで、多くの種類の発癌遺伝子がヒトを含む温血動物から見出され、現在もさらに新たな発癌遺伝子の発見が続いている。特に最近は、ニワトリのレトロウイルスから見出された発癌遺伝子の他に、NIH3T3と呼ばれるマウスの線維芽細胞を形質転換するという系を用いて、新たな発癌遺伝子が見出されている。発癌遺伝子には多くの種類(ras, src, myc, 等)が知られているが、上記のような系を用いて見出される発癌遺伝子には ras 系のものが多い(由来によりさらに K-ras, H-ras, N-ras などに分けられている)。また、ras 遺伝子(実際は ras 遺伝子に変異により活性化されたもの)による発癌が実際にヒトで頻ばんにおきていることが知られている。興味あることは、これらの遺伝子の多くは、ras 蛋白(ras 遺伝子からの生産物)のN末端より12番目のグリシン

酵母と略す)では、これら2個の酵母の RAS 遺伝子を不活性化するとその酵母は増殖できなくなること(Fatchell, 等、ネイチャー(Nature)、309, 523, 1984)、さらに興味あることには、RAS2蛋白(酵母のRAS2遺伝子からの産物)のN末端から19番目のグリシン(これはヒト ras 蛋白の12番目のグリシンに相当する)がバリン変わるとその酵母は胞子形成能がなくなることが見出された(Kataoka, T等、セル(Cell)37, 437, 1984)。また、RAS2遺伝子が上記のように変異した場合、その酵母を胞子形成条件下(通常、細胞の増殖はできない)においても増殖の cell cycle は働くが、増殖に必要な栄養源がないため結果的にその酵母は死滅することもわかった。つまり酵母の RAS 遺伝子(或いは RAS 蛋白)は、酵母の増殖に必須ではあるが、その遺伝子にある変異、例えばRAS2遺伝子の場合にはN末端から19番目のグリシンがバリンに変わるような変異がおきると、分化の機構(酵母では胞子形成が“分化”と考えられている)が働かなくなり増殖のみが促進されることを示し

ている。ヒトの癌細胞が分化することなく異常な増殖すること、そしてそれがras 遺伝子の変異によることから考え、酵母におけるRAS 遺伝子の変異による上記のような現象は酵母の“癌化”と考えることができる。このように酵母のRAS 遺伝子は学問上興味あるばかりでなく、ヒトの癌化の生物学的機構を解明する上でも興味深い。

一方、ras 蛋白（特に動物由来）の生物学的機能についても種々の知見が得られている。例えば、ras 蛋白が、細胞表面レセプターに結合して細胞の機能や代謝に変化をもたらす信号の働きをするグアニントリフォスフェイト(guanine triphosphate: GTP)結合蛋白(G 蛋白と呼ばれている)と同様な機能を有することが示唆されている【Kurleg, J.B. 等サイエンス(Science)226, 860, 1984】。また、ras 蛋白は ATP から cAMP への反応をもたらすアデニル酸シクラーゼ(adenylate cyclase)の活性を調節(実際は活性化)し、cAMP 量の増加は cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性をもたらす、その結果リン酸化された蛋白が何らかの形で細胞の増

殖または cell cycle、さらには分化の調節を行っていることが推察されている。そして、酵母の

RAS 遺伝子も上記と同様なカスケードにより酵母の cell cycle や胞子形成(分化)の調節に関与しているのではないかと考えられている【Toda, T. 等、セル(Cell)40, 27, 1985】。

近年、ヒトや動物における発癌のメカニズムは急速に明らかにされつつあるが、癌の治療は今世紀に残された医学上解決されなければならない問題の1つである。

癌の化学的治療の面からみると、これまでの治療剤には、細胞特に細胞の増殖に対して強い毒性を示すものが多い。これは、生後ある期間を過ぎると正常な細胞は特定の細胞を除きほとんど増殖しないのに対し、癌細胞は異常な増殖をすることにに基づいている。細胞に毒性を示すものとして、蛋白合成阻害剤、転写阻害剤、DNA 合成阻害剤などが考えられているが、これらの薬剤の作用は、非特異的であり正常細胞の機能まで阻害し、これらを投与した場合重大な副作用をもたらす危険性

がある。従って、癌細胞のみに作用する薬剤が強く望まれる。近年、免疫学的な面から癌細胞に特異的に作用する抗体や免疫関連物質の開発が進められているが、化学療法剤においては癌細胞のみ特異的に作用するよう薬剤はこれまで開発されておらずまたそのような薬剤をスクリーニングするシステムも開発されていない。

#### (発明が解決しようとする問題点)

従ってこの発明は、癌に対する新しいタイプの化学療法剤をスクリーニングするための新規なスクリーニングシステムを提供することを目的とする。

本発明者らは、既述の癌に関する分子生物学的知見即ち、ヒトの ras 遺伝子の変異により癌が誘発されること、ヒトの ras 遺伝子と類似性(ホモロジー)のある酵母の RAS 遺伝子の変異が、ヒトの癌化の状態と類似する現象(即ち、分化の機構である胞子形成過程が働かず常に増殖の状態にあるという現象)をもたらすという知見をもとに、

酵母を用い癌細胞に特異的に作用する薬剤のスクリーニングシステムができるのではないかと考え鋭意研究に取り組んだ。即ち本発明者らは、酵母の RAS 遺伝子の変異によって失われた胞子形成能を回復できるような薬剤、つまり RAS 変異蛋白の活性を不活性にするかあるいは正常な機能に戻すような薬剤を選べば、その中には、ras 変異をもったヒトや動物の癌細胞または癌組織に特異的に作用する薬剤が見出されるのではないかと考えた。

従ってこの発明の一層具体的な目的は、前記の変異 RAS 遺伝子、酵母の胞子形成に関与する遺伝子等を遺伝子工学的手法により巧みに利用して、癌に対する化学療法剤の検出容易なスクリーニングシステムを提供することである。

#### (問題点を解決するための手段)

上記のような考え方に基づいて抗癌剤のスクリーニング系を確立するためには、まず通常の胞子形成条件下で胞子が形成され、それが容易に検出できる系を入手する必要がある。

しかしながら、胞子の形成それ自体を検出することは必ずしも容易ではない。従って本発明においては、胞子の形成に関与する遺伝子の下流に大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子を連結することによって前記胞子形成に関与する遺伝子が発現されればそれに伴って前記 $\beta$ -ガラクトシダーゼの遺伝子が発現されるようにし、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現を公知の呈色反応で検出することにより間接的に胞子形成に関与する遺伝子の発現が検出できるようにした。従ってこの発明はまず、酵母の胞子形成に関与する遺伝子の下流に大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域が連結された DNA断片が組み込まれた酵母プラスミドを提供する。

本発明のスクリーニング系は上記の胞子形成系に加えて変異 RAS遺伝子系を含まなければならない。従ってこの発明はさらに、酵母の胞子形成に関与する遺伝子が発現されるとそれに伴って大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域も発現されるように酵母の胞子形成に関与する遺伝子と

大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域が連結された DNA断片および動物の発癌遺伝子とホモロジーを有し且つ突然変異を含む遺伝子が組み込まれた酵母プラスミドを提供する。このプラスミドにおいては、変異 RAS遺伝子の発現生成物(蛋白)の作用に起因して胞子形成遺伝子の発現が抑制されているが、該発現生成物に対してなんらかの阻害で拮抗する物質(候補抗癌剤)が添加されれば前記発現生成物の機能がブロックされ胞子形成遺伝子が発現し、この発現が $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現を介して検出される。

上記のようなプラスミドの機能は言うまでもなく宿主酵母中で発揮されるが、前記胞子形成に関与する遺伝子が発現するためには前記宿主はヘテロ型2倍体酵母でなければならない。従ってこの発明はさらに、酵母の胞子形成に関与する遺伝子が発現されるとそれに伴って大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域も発現されるように酵母の胞子形成に関与する遺伝子と大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域とが連結された

DNA断片、および動物の発癌遺伝子とホモロジーを有し且つ突然変異を含む酵母由来の遺伝子が組み込まれた酵母プラスミドによって形質転換された MATa/MAT $\alpha$ 型2倍体酵母形質転換株を提供する。これにより、この発明の第1のスクリーニング系が確立される。

しかしながら、宿主が1倍体酵母又はホモ型2倍体酵母であっても、これらの酵母が染色体上に有しない方の接合型対立遺伝子をプラスミドにより導入すれば胞子形成遺伝子を発現せしめることができる。従ってこの発明はさらに、動物の発癌遺伝子とホモロジーを有し且つ突然変異を含む酵母由来の遺伝子と、MATaまたは MAT $\alpha$ で表される酵母の接合型支配対立遺伝子とが組み込まれた酵母プラスミドを提供する。

このプラスミドを、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ構造遺伝子に連結された胞子形成に関与する遺伝子を含む前記のプラスミドと共にMATa型又はMAT $\alpha$ 型の1倍体酵母に形質転換することにより前記とは異なる第2のスクリーニング系が確立される。従っ

てこの発明はさらに、酵母の胞子形成に関与する遺伝子が発現されるとそれに伴って大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子も発現されるように酵母の胞子形成に関与する遺伝子と大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子とが連結された DNA断片が組み込まれた酵母プラスミドと、動物の発癌遺伝子とホモロジーを有し且つ突然変異を含む酵母由来の遺伝子とMATaまたはMAT $\alpha$ で表される酵母の接合型支配対立遺伝子とが組み込まれた酵母プラスミドとによって形質転換された1倍体酵母形質転換株を提供する。

同様にしてこの発明は、酵母の胞子形成に関与する遺伝子が発現されるとそれに伴って大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域も発現されるように酵母の胞子形成に関与する遺伝子と大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域とが連結された DNA断片、および動物の発癌遺伝子とホモロジーを有し且つ突然変異を含む酵母由来の遺伝子が組み込まれた酵母プラスミドと、MATaまたは MAT $\alpha$ で表わされる酵母の接合型支配対立遺伝

子とが組み込まれた酵母プラスミドとによって形質転換された1倍体酵母形質転換株を提供する。

前記のいずれのスクリーニング系においても、変異 RAS遺伝子をプラスミドにより宿主に導入したが、染色体上に RAS変異を有する宿主を用いることもできる。すなわち、核内染色体上に RAS変異を有する1倍体酵母を、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ構造遺伝子に連結された胞子形成に関与する遺伝子を含有するプラスミド及び MAT $\alpha$ または MAT $\alpha$ 遺伝子を含有するプラスミドによって形質転換するか、あるいは核内染色体上に RAS変異と sir3変異(1倍体であるが、接合型がヘテロの状態になっているために接合能を示さない変異)を有する宿主を $\beta$ -ガラクトシダーゼが構造遺伝子に連結された胞子形成に関連する遺伝子を含有するプラスミドによって形質転換することにより第3のスクリーニング形が確立される。

従ってこの発明はさらに、酵母の胞子形成に関与する遺伝子が発現されるとそれに伴って大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域も発現さ

れるように酵母の胞子形成に関与する遺伝子と大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域とが連結された DNA断片が組み込まれている酵母プラスミド、および MAT $\alpha$ または MAT $\alpha$ で表わされる酵母の接合型支配対立遺伝子が組み込まれたプラスミドによって形質転換された、核内染色体上に RAS変異をもつ1倍体形質転換株；並びに、酵母の胞子形成に関与する遺伝子が発現されるとそれに伴って大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域も発現されるように酵母の胞子形成に関与する遺伝子と大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域とが連結された DNA断片が組み込まれている酵母プラスミドによって形質転換された、核内染色体上に RAS変異と sir3変異をもつ1倍体形質転換株を提供する。

この発明に最後に、上記の種々の形質転換株を SPO-X-GAL培地上で培養してコロニーを形成せしめ、被験物質の存在下で該コロニーを青色にすることができる該被験物質を選択することと特徴とする抗癌または制癌作用を有する物質のスクリー

ニング法を提供する。

(具体的な説明)

次に前記のプラスミドを作製するための方法を具体的に説明する。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (以下酵母と略す) には、哺乳動物の ras遺伝子と高いホモロジーを有する2種類の酵母 RAS遺伝子(以下、RAS1, RAS2と略す)が知られているが、本発明者らは既に報告されている論文(Powers, S. 等セル(Cell)36, 607, 1984 および Defeo-Jones, 等ネイチャー(Nature) 306, 707, 1983)を参考にして酵母(X2180-18株)から RAS2遺伝子を単離する(第2図)。次に、M13ファージを用いた in vitro mutation法(Zoller, M.J. 及び Smith, M. ニュウクレイック・アシド・リサーチ(Nucl. Acid. Res)10, 6487, 1982)により、RAS2蛋白のN末端から19番目のグリシン(Gly)がバリン(Val)に成いは68番目のグルタミン(Gln)がロイシン(Leu)になるようにRAS2遺伝子

上の塩基配列に変異をもたらす(以下、各々の変異を RAS2<sup>Val</sup>, RAS2<sup>Leu</sup> で表わす; 第2図から第4図参照)、これを大腸菌・酵母シャトルベクターに挿入したプラスミド(以下、各々を  $\mu$  LAS2<sup>Val</sup>,  $\mu$  LAS2<sup>Leu</sup> で表わす; 第5図、第6図参照)を造成する。

一方、胞子形成(つまり酵母における“分化”)の有無を容易に判定できるような酵母を作製するため、第1図に示すように、酵母の胞子形成に関与する遺伝子の1つである SPOT7 が、プラスミド YE<sub>13</sub>にクローン化されたプラスミド 125L-184(大阪市立大壺井博士より譲渡)を種々の制限酵素およびエキソヌクレアーゼ Ba $\alpha$  31で処理することにより SPOT7遺伝子を小片化後(A, B, C, Dグループ: 第1図-B)、この断片と、YE<sub>13</sub>の Ap<sup>r</sup>(アンピシリン耐性遺伝子)、LEU2(酵母の LEU2遺伝子)および IRI1(酵母のレプリコンの1つ)を含む Sal-HindIII断片、並びにプラスミド pMC1403(Ca-sadaban-プラスミドとも呼ばれる: ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J. Bacteriol.)143, 971,

1980) の  $'lacZ$  ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の1部)を含む  $SmaI-Sall$ 断片を連結させたプラスミド  $YE_{pA} \sim YE_{pD}$  を造成し、 $LEU2$ マーカーを指標にこれを  $a/\alpha$ 型2倍体酵母に導入する。次に、胞子形成できる条件となる酢酸カリウムを含み、 $40 \mu g/ml$  の  $X-GAL$  および  $50mM$  リン酸カリウム緩衝液を含む  $X-GAL$ 寒天培地(以下  $SP0-X-GAL$ 培地と略す)上で青色のコロニーとなる形質転換体を分離し、該形質転換株から  $SP0T7$ 遺伝子断片を含むプラスミド例えば  $YE_{pB3}$ を回収する。なお、プラスミド  $YE_{pB3}$ は大腸菌  $JA221$ 株に導入され、この菌株  $JA221/YE_{pB3}$ は  $SBH277$ と命名され、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第8147号(FERM P-8147)として寄託されている。このプラスミドをもつ形質転換酵母株は、胞子形成条件下では  $SP0T7$ 遺伝子が発現されると  $SP0T7$ からの read throughにより  $\beta$ -ガラクトシダーゼも産生されその結果  $X-GAL$ 寒天培地で青色のコロニーとなる( $'lacZ$ は  $SP0T7$ 構造遺伝子中の下流部に読み枠が合うように連結されている)。即ち、 $SP0-$

$X-GAL$ 培地で青色になるか否かにより、胞子形成("分化")の有無を容易に判別することができる。尚、 $SP0T7$ の構造遺伝子領域は、胞子形成条件下で発現されるものであれば  $SP0T7$ 遺伝子のプロモータ以外の適当なプロモータによって発現させてもよい。

続いて、この  $YE_{pB3}$ と先に造成した酵母の変異  $RAS2$ 遺伝子を含むプラスミド  $pRAS2^{***}$  または  $pRAS2^{****}$ 、とシタトルベクターである  $YE_{p13}$ とから第7図に示すような工程で、本発明の1つであるプラスミド  $YE_{pB3-RAS2}$ (具体的には  $YE_{pB3-RAS2^{***}}$ と  $YE_{pB3-RAS2^{****}}$ :この2つのプラスミドを総称し  $YE_{pB3-RAS2}$ と呼ぶこともある。)を造成する。このプラスミド  $YE_{pB3-RAS2^{***}}$ は大腸菌  $JA221$ 株に導入され、この菌株  $JA221/YE_{pB3-RAS2^{***}}$ は  $SBH279$ と命名され、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第8149号(FERM P-8149)として寄託されている。

尚、第7図の  $YE_{pB3-RAS2}$ においては、 $SP0T7-lacZ$ 遺伝子に隣接して、変異  $RAS2$ 遺伝子(第7

図では  $RAS2$ で表わされている)が連結されているが、該  $RAS$ 遺伝子の位置は必ずしもこれに限るものでない。例えば、後述するように染色体DNAに組み込まれたものであってもよい。また、変異  $RAS$ の構造遺伝子は他の適当な酵母のプロモータ支配下に発現されてもよい。さらに、ここでは胞子形成に関与する遺伝子としては  $SP0T7$ を用いているが、胞子形成条件下に発現される遺伝子であればこれに限るものではない。

また、酵母の変異  $RAS$ 遺伝子として  $RAS2^{***}$  および  $RAS2^{****}$ を用いているが、既述したように胞子形成条件下で胞子形成せず細胞が死に至るような変異  $RAS$ 遺伝子であればこれらに限るものではない。

酵母には  $MATa$ と  $MAT\alpha$ (或いは  $a$ と  $\alpha$ )で表わされる接合型が存在するが、酵母が胞子形成するにはこれらの接合型を支配する対立遺伝子(各々  $MATa$ と  $MAT\alpha$ で表わす)がヘテロ型(例えば遺伝子型として  $MATa/MAT\alpha$ 型:  $a/\alpha$ で表わされることもある)になっていることが必須である。従

って、1倍体酵母(通常1倍体は  $MATa$ または  $MAT\alpha$ のいずれか1つの遺伝子をもつ)や同型接合型2倍体( $MATa$ または  $MAT\alpha$ のいずれかを2個もつ)などでは通常胞子形成能を有しない。従って、第1図で造成されるプラスミド  $YE_{pB3}$ 上の  $SP0T7$ 遺伝子は、該プラスミドを  $a/\alpha$ 型2倍体宿主に導入しないと発現しない。従って、第7図に示したプラスミド  $YE_{pB3-RAS2}$ も  $a/\alpha$ 型2倍体に導入する必要がある。

そこで、本発明者らは、1倍体酵母を宿主として使用して本発明の目的のために使用できるようなプラスミド群を造成した(第8図および第9図)。まず、形質転換体の選択マーカーとなる  $URA3$ 遺伝子と酵母の  $MATa$ または  $MAT\alpha$ 遺伝子を含むプラスミド  $YC_{pMATa}$ および  $YC_{pMAT\alpha}$ を、プラスミド  $DX$ ( $MATa$ )または  $2.5(MAT\alpha)$ (いずれもコールドスプリングハーバー研究所の J. Hicks 博士より大阪大学・工学部大嶋泰治博士経由で譲渡)およびシタトルベクター  $YC_{p19}$ (Stinchcomb, D.T. ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol.



Biol.)158,157,1982) から造成する (第8図)。このプラスミドは、これを導入することにより1倍体酵母の接合型支配対立遺伝子型をヘテロ (遺伝子型として  $MATa/MAT\alpha$ ) にするためのもので、 $MATa$  の1倍体に対しては  $YC_pMAT\alpha$  を、 $MAT\alpha$  の1倍体に対しては  $YC_pMATa$  を導入することにより該遺伝子型をヘテロにすることができる。つまり、1倍体酵母に  $YC_pMATa$  または  $YC_pMAT\alpha$  と第2図に示した  $YE_{pB3}-RAS2$  とを形質転換すれば本発明の目的の1つとする形質転換酵母が得られる。

$MATa$  または  $MAT\alpha$  遺伝子は、酵母の変異  $RAS$  遺伝子をもつプラスミド  $pRAS2^{val}$  または  $pRAS2^{leu}$  (第7図参照) に組み込んでよい。第9図は、 $MATa$  遺伝子と変異  $RAS2$  遺伝子 ( $RAS2^{val}$  又は  $RAS2^{leu}$ ) を組み込んだプラスミド  $YC_pMATa-RAS2$  ( $YC_pMATa-RAS2^{val}$  と  $YC_pMATa-RAS2^{leu}$  の総称) の造成の概略を示したものである。第8図のように、該プラスミドは、先に造成した  $pRAS2^{val}$  または  $pRAS2^{leu}$  (第7図参照)、 $Dx(MATa)$  および  $YC_{p19}$  から容易に造成することが

できる。このプラスミドを、胞子形成に関与する遺伝子例えば  $SPOT7$  をもつプラスミド  $YE_{pB3}$

(第1図参照) とともに  $MAT\alpha$  の1倍体酵母に導入すれば、本発明の目的に適した形質転換株を得ることができる。なお、プラスミド  $YC_pMATa-RAS2^{val}$  は大腸菌  $JA221$  株に導入され、この菌株  $JA221/YC_pMATa-RAS2^{val}$  は  $SBM278$  と命名され、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第8148号 (FERM P-8148) として寄託されている。

次に、上記のようにして造成された一連のプラスミドによって形質転換された酵母を用いて、はたして酵母の胞子形成即ち“分化”が  $SPO-X-GAL$  培地上で判別できるか否かを検討した (第1, 第2, 第3表参照)。

以下余白

第1表

SPOT7- <sup>+</sup> lacZ発現における接合型依存性		
酵母宿主	プラスミド	SPO-X-GAL 培地 (*) における呈色性
R1-61A $MATa/MAT\alpha$	$YE_{pB3}$	青色
R3-6A $MATa$	$YE_{pB3}$	白色
R3-6A $MATa$	$YE_{pB3} + YC_pMAT\alpha$	青色
R3-4D $MAT\alpha$	$YE_{pB3}$	白色
R3-4D $MAT\alpha$	$YE_{pB3} + YC_pMATa$	青色
yS35-10D $MAT\alpha sir-3-8$	$YE_{pB3}$	青色 (35℃) 白色 (25℃)

(\*) 40  $\mu g/ml$  の  $X-Gal$  (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド) を含む胞子形成培地。

第1表は、形質転換株の接合型支配対立遺伝子がヘテロ型になると、プラスミド  $YE_{pB3}$  上の胞子形成に関与する遺伝子 ( $SPOT7$ ) が発現され (即ち“分化”の系が働き) それに伴う  $\beta$ -ガラクトシダーゼの産生により、該形質転換株は  $SPO-X-GAL$  培地上で青色コロニーとなり、接合型支配対立遺伝子がヘテロでない場合は該形質転換株の  $SPO-X-$

$GAL$  培地上で白色のままであることを確認したコントロールの実験の結果を示したもので、期待通りの現象が得られたことを示している。

第2表

活性型 $RAS$ 変異における $SPOT7-^+ lacZ$ の発現			
酵母宿主	接合型遺伝子座	プラスミド	SPO-X-Gal 培地 における呈色性
R1-61A	$MATa/MAT\alpha$	$YE_{pB3}-RAS2$	青
"	"	$YE_{pB3}-RAS2^{val}$	白
"	"	$YE_{pB3}-RAS2^{leu}$	白
R3-4D	$MAT\alpha$	$YE_{pB3} + YC_pMATa-RAS2$	青
"	"	$YE_{pB3} + YC_pMATa-RAS2^{val}$	白
"	"	$YE_{pB3} + YC_pMATa-RAS2^{leu}$	白
"	"	$YE_{pB3}-RAS2 + YC_pMATa$	青
"	"	$YE_{pB3}-RAS2^{val} + YC_pMATa$	白
"	"	$YE_{pB3}-RAS2^{leu} + YC_pMATa$	白
" ( $RAS2^{val}$ ) "	"	$YE_{pB3} + YC_pMATa$	白

注: 染色体上に  $RAS^{val}$  遺伝子をもつ宿主

第2表は、酵母の変異  $RAS2$  遺伝子をもつプラスミド、 $YE_{pB3}-RAS2^{val}$  もしくは  $YE_{pB3}-RAS2^{leu}$ 、